

EXPRESS MAIL CERTIFICATE

Date 6/15/01 Label No. 647 067 429 46US

I hereby certify that, on the date indicated above, this paper or fee was deposited with the U.S. Postal Service & that it was addressed for delivery to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231 by "Express Mail Post Office to Addressee" service.

Name (Print)

Signature

SYSTEME DE DISTRIBUTION PARALLELE ET SELECTIVE DE MICRO-GOUTTELETTES A HAUT RENDEMENT, CARTOUCHE TRANSPORTABLE AINSI QUE KIT DE DISTRIBUTION DE MISE EN ŒUVRE, ET APPLICATIONS D'UN TEL SYSTEME

5

L'invention concerne un système de distribution parallèle et sélective, à haut rendement, de micro-gouttelettes de volume extrêmement réduit -de l'ordre d'un sous-multiple de nano-litre, voire d'un sous-multiple de pico-litre-, des cartouches transportables et un kit pour mettre en œuvre une telle distribution, ainsi que les applications de ce système, notamment dans les domaines de la chimie, de la biologie, de la biotechnologie ou de la pharmacie, -en particulier pour la réalisation de bio-puces, pour des tests pharmaceutiques, immunologiques ou biochimiques, pour le criblage de chimiothèques ou de sérothèques, la préparation de médicaments ou leur administration percutanée par iono-phorèse-, ou encore dans les domaines de la cosmétique, pour la réalisation de diffuseurs de parfums ou d'aérosols, d'impression par jet d'encre ou de l'électronique automobile, en particulier dans les injecteurs de carburant ou de gas-oils.

Les récents progrès en matière de recherche génomique et protéomique permettent de disposer d'un nombre considérable de molécules biologiques et thérapeutiques à tester. Cependant, les faibles quantités de produits biochimiques disponibles ainsi que leur coût élevé ont conduit à rechercher une augmentation sensible des capacités d'expérimentation par optimisation du rendement.

Pour ce faire, différentes techniques ont été appliquées à la manipulation de liquides biochimiques, tels que les systèmes de repiquage ou de micro-pipetage avec des actionneurs piézoélectriques et, plus récemment, la technique d'impression par jet d'encre.

Le but de ces technologies est la préparation de bio-puces par l'impression de sondes biologiques (d'oligonucléotides, protéines, peptides, etc..), pré-synthétisées dans la majorité des cas, sur une surface de différents types de support, tels que verre, nylon® ou cellulose®.

Il est par exemple connu des documents US 5,053,100 ou US 6,083,762, des pipetages qui utilisent un actionneur piézoélectrique sur une micro-pipette. Cette technique permet l'impression d'oligonucléotides pré-

synthétisés ou synthétisés in situ. Cependant, ces systèmes sont fabriqués à l'unité et sont inaptes à la distribution parallèle à haute densité.

Dans le document US 6,028,189, la distribution de réactifs est effectuée par l'utilisation de micro-pompes de type à jet d'encre, activées par un actionneur piézoélectrique. Chaque micro-pompe est réalisée dans un bloc de silicium, avec des canaux d'alimentation et d'éjection des gouttelettes. Afin de réaliser des synthèses in situ, quatre micro-pompes délivrent des bases d'ADN par éjection dans des puits circulaires, formés sur un substrat de verre commandé en déplacement selon deux axes.

Ces systèmes ne permettent pas de réaliser une impression à très haut rendement au sens de la présente invention, c'est-à-dire quelques centaines à quelques milliers de gouttes par cm^2 : avec quatre pompes opérant à quelques centaines de Hz, une machine selon le document précédent imprimerait 100 000 gouttes en quelques centaines de secondes. La synthèse de sondes de 25 oligonucléotides nécessiterait alors plus de 2 heures.

L'invention vise à permettre une augmentation considérable du rendement de distribution sélective de micro-gouttelettes, par une forte augmentation de la densité d'impressions parallèles, comparable aux densités obtenues par la photochimie pour l'immobilisation de molécules spécifiques à travers des masques de photolithographie. Cette méthode est limitée aux molécules pouvant être fixées par photochimie et ne permet fondamentalement pas de manipuler individuellement des gouttelettes de réactifs. De plus, la synthèse in situ, par cette méthode, est limitée à environ 25 mononucléotides.

Un autre but de l'invention est de permettre de réaliser une sélectivité non seulement spatiale, en permettant de distribuer le réactif sur des sites prédéterminés ou programmés, mais également ciblée en distribuant un réactif sélectionné parmi plusieurs sur le site prédéterminé.

L'invention vise également à réaliser un système multifonctionnel et facile à adapter sous différentes formes, par exemple sous forme de kits miniatures d'analyse biologique ou biochimique pour permettre un grand nombre d'applications. En particulier, l'invention permet de ne pas se limiter à la synthèse de 25 nucléotides par sonde mais de synthétiser des sondes longues pouvant atteindre, par exemple, 70 nucléotides, tout en conservant un rendement élevé.

Ces buts sont atteints en utilisant une tête d'impression dans laquelle est réalisée, par des techniques de type microélectroniques à haute densité, une matrice de puits de forme particulière et alimentés suivant une connectique spécifique pour une distribution sélective à haut débit.

5 Plus précisément, l'invention a pour objet un système de distribution de micro-gouttelettes à haut rendement, comportant un substrat recouvert d'une membrane et des moyens de déformation de la membrane au droit de chaque cavité formée dans le substrat, et dans lequel les cavités, gravées dans un matériau constituant le substrat, se présentent sous forme de
10 puits traversant le substrat avec une paroi latérale continue de symétrie axiale; chaque puits débouche sur la face supérieure et la face inférieure du substrat selon respectivement un orifice d'alimentation et une buse ouverte selon un orifice d'éjection, l'orifice d'alimentation présentant une ouverture supérieure à l'orifice de la buse et la buse présentant un rapport de forme de l'ordre de 1 à
15 20.

Selon l'invention, il convient de comprendre par distribution l'éjection ou l'aspiration de micro-gouttelettes, par haut rendement de quelques dizaines à quelques milliers de micro-gouttelettes distribuées parallèlement en une fraction de seconde, par paroi à symétrie axiale une
20 paroi de révolution ou cylindrique, par exemple de section carrée, et par rapport de forme le rapport entre la hauteur et l'ouverture de la buse de sortie.

Pour atteindre ce type de rendement, le substrat présente une densité de puits pouvant atteindre 10 000 par cm^2 , avec un débit pouvant dépasser 1 million de gouttelettes à la seconde.

25 Avantageusement, le matériau du substrat est choisi parmi les matériaux semi-conducteurs tels que le silicium, l'arséniure de gallium, le carbure de silicium, le germanium, les composites d'oxydes et d'isolant (tels que le SOI, initiales de silicium-oyde-isolant), les verres, les nitrures de silicium, le polysilicium, les céramiques, les matériaux thermoplastiques, -tels
30 que le polyméthacrylate de méthyle, les polycarbonates, le polytétrafluoroéthylène, le chlorure de polyvinyle ou le polydiméthylsiloxane, les résines photosensibles épaisses (par exemple la résine « SU8 »)-, ainsi que les métaux, tels que le tungstène ou les aciers inoxydables.

35 De manière préférée, les techniques de micro-fabrication pour réaliser les puits ou les micro-canaux sont choisies en fonction du matériau du substrat :

- gravures chimiques humides ou sèches telles que la gravure ionique réactive (en abrégé RIE) ou la gravure profonde (en abrégé D-RIE) pour le silicium et verre ;

- gravure par électroérosion ou électroformage pour les métaux ;

- moulage et polymérisation pour les matériaux thermoplastiques ;

- photolithographie, découpage au laser, ultrasons, ou par projection d'abrasifs pour la plupart des substrats.

10 Selon des modes préférés, le matériau de la membrane est choisi entre le verre, le silicium, les élastomères et les matériaux thermoplastiques; la membrane peut être gravée par les techniques de gravure citées plus haut, afin de réaliser un réseau de micro-canaux d'alimentation des puits, ces micro-canaux étant couplés en extrémité à au moins un réservoir d'alimentation en réactif.

15 Dans des modes de réalisation particuliers, les moyens de déformation locale de la membrane sont constitués par des actionneurs électromagnétiques, magnétostrictifs ou piézoélectriques. Des moyens alternatifs sont également prévus tels que les moyens thermiques de type jet d'encre ou thermoélastiques par effet de type bilame, l'électro-vaporisation produit par un champ électrique localisé entre chaque puits, ou encore des actionneurs électrostatiques.

20 L'ensemble des moyens de déformation peut être géré par une unité de commande programmable à travers un réseau de multiplexage. Une telle unité permet de déclencher simultanément ou successivement l'aspiration ou la distribution de réactifs identiques ou différents à travers tous les puits, à travers des blocs de puits ou certains puits.

30 Selon des modes de réalisation particuliers, la tête d'impression possède quatre ou un multiple de quatre lignes et un nombre de colonnes de puits adapté à la densité souhaitée, afin de procéder à la synthèse de sondes d'ADN à partir des quatre monomères de base des nucléotides pour la préparation de bio-puces. Les puits de chaque ligne sont alimentés par un même réservoir à travers un micro-canal formé dans la membrane parallèlement à la ligne de puits et couplé latéralement à la ligne ou orthogonalement au plan du substrat, les réservoirs étant gravés dans la

membrane ou disposés à distance et reliés aux micro-canaux par des connexions souples.

L'invention concerne également les applications de la tête d'impression définie ci-dessus. Pour mettre en œuvre au moins certaines d'entre elles, il est avantageux de préparer un ensemble prêt à l'emploi sous forme de :

- cartouche de distribution comprenant au moins une tête d'impression préremplie de réactifs et de plaquettes de titration en matériau semi-conducteur ou thermoplastique, pouvant présenter des micro-cuvettes formées par gravure de type micro-électronique, par usinage, par moulage, par thermoformage, ou toute technique adaptée à une telle fabrication ;

- kit de distribution comprenant au moins une tête d'impression, pouvant être équipée d'au moins une pompe d'aspiration, et au moins une plaquette de Titration, préremplies ou non de réactif.

Ces cartouches ou ces kits sont plus particulièrement destiné(e)s à la préparation de bio-puces, par synthèse in situ ou dépôt d'oligonucléotides pré-synthétisés, au criblage collectif ou individuel sur molécules biologiques ou sur cellules, à la préparation de médicaments ou aux tests pharmaceutiques ou de dépistage immunologique, biochimiques et biologiques.

L'administration percutanée de médicaments par iono-phorèse peut être réalisée à partir d'une tête d'impression définie précédemment comportant un plusieurs puits. Un système d'application d'une différence de potentiel adéquate sur une cellule piézoélectrique, ou tout moyen de déclenchement électromagnétique, forme un dispositif d'administration d'une quantité calibrée d'au moins un médicament contenu ou formé dans ce puits.

Outre les applications citées plus haut, l'invention peut également être utilisée pour la séparation et le tri, par exemple en chromatographie par filtration sélective. Sur les parois des puits d'une tête d'impression selon l'invention sont d'abord fixées, greffées, bloquées ou accrochées, par tout moyen connu, des bio-cellules identiques ou différentes par puits ou par blocs de puits. La tête d'impression peut être intégrée à l'embout d'une seringue.

D'autres caractéristiques, avantages et applications apparaîtront également dans la suite de la description qui détaille, plus particulièrement, des exemples mis en œuvre non limitatifs de la présente

invention, en référence aux figures annexées qui représentent, respectivement :

- 5 - la figure 1, une vue schématique partielle en perspective d'une tête de distribution limitée à l'environnement d'un puits de base d'un système selon l'invention ;
- la figure 2, une vue en coupe selon II-II de la tête selon la figure 1 avec un réservoir de remplissage ;
- la figure 3, une vue schématique en perspective d'une tête de distribution d'un système selon l'invention à huit puits de distribution ;
- 10 - la figure 4, une vue en coupe selon IV-IV de la figure précédente ;
- la figure 5, une vue schématique en perspective d'une tête de distribution d'un système selon l'invention à seize puits de distribution ;
- 15 - la figure 6, une vue en coupe selon V-V de la figure précédente ;
- les figures 7 et 8, deux vues cavalières de la face inférieure de la tête de distribution du système selon la figure 5 et selon une variante ;
- la figure 9, une vue en perspective du système selon la figure 5 avec des moyens de distribution d'un réactif à distance ;
- 20 - la figure 10, une vue en perspective du système selon la figure 5 avec des moyens de distribution à distance de quatre mononucléides pour former des sondes sur une lame mobile ;
- la figure 11, une vue en coupe schématique d'un système de distribution selon l'invention illustrant le principe d'actionnement sélectif des puits de distribution ;
- 25 - les figures 12a et 12b, des vues en coupe illustrant les deux phases d'actionnement d'un puits par des moyens électromagnétiques de déclenchement sélectif ;
- les figures 13a et 13b, une vue en coupe d'un système de
- 30 distribution selon l'invention, illustrant l'actionnement sélectif respectivement par des moyens électromagnétiques et des moyens piézoélectriques de déclenchement sélectif ;
- la figure 14, une vue en coupe d'une tête de distribution en phase de remplissage par aspiration de réactifs pour la préparation d'une
- 35 cartouche de distribution selon l'invention ;

- la figure 15, une vue en coupe d'un système de distribution selon l'invention appliqué au traitement de cellules sur une plaquette de titration ;

5 - la figure 16, une vue en coupe d'un système de distribution selon l'invention appliqué à la détection d'hybridation dans le cadre d'un test génétique;

- la figure 17, une vue en coupe d'un système de distribution selon l'invention appliquée à l'administration percutanée de médicaments.

10 Sur toutes les figures, des signes de référence identiques désignent des éléments identiques ou techniquement équivalents. Les membranes apparaissent en transparence afin de faciliter la visualisation de l'ensemble des éléments représentés.

Un exemple de tête de distribution 1 est illustré en figure 1, telle que limitée à son environnement autour d'un puits de distribution 10.
15 Chaque puits 10 a été gravé par photolithographie suivie d'une gravure humide chimique dans un substrat de silicium 2 recouvert d'une membrane 3 en pyrex[®], la membrane et le substrat sont assemblés par soudure anodique pour former la tête 1.

20 Le puits 10 possède une forme pyramidale inversée, et traverse de part en part le substrat de silicium 2 selon quatre parois continûment inclinées 11 et définies par les plans cristallins 1-1-1 du silicium. L'ouverture supérieure 12 du puits, qui communique avec la membrane 3, forme un carré de côté supérieur au côté de l'orifice inférieure 13 afin d'accélérer l'éjection des gouttelettes. Un micro-canal 20 d'alimentation ou
25 d'évacuation du puits en réactif est usiné dans la membrane 3.

Dans cet exemple de réalisation, les dimensions de puits sont les suivantes :

- côté de l'ouverture supérieure: 500µm
- côté de l'orifice inférieure: entre 10 et 50 µm (environ 30 µm)
- 30 - épaisseur de la membrane : 10 à 50 µm
- épaisseur du substrat : 360 µm

En vue en coupe selon la figure 2 selon II-II, il apparaît que le micro-canal 13 communique avec un réservoir d'alimentation ou de stockage 4 de réactif 5. Il est également montré sur cette vue que la face inférieure 2i
35 sensiblement plane du substrat 2 forme saillie autour des parois latérales 11 du puits 10 de manière à prolonger ces parois en formant une buse 14. De

telles buses sont obtenues par usinage de la face inférieure. La hauteur H d'une telle buse rapportée au côté C, côté de l'orifice 13, mesure le rapport de forme environ égal à 3 dans l'exemple, qui améliore la formation de micro-gouttelettes de volume de l'ordre du picolitre. La valeur du rapport de forme est limitée par des contraintes technologiques et un bon compromis est à rechercher entre 1 et 20, suivant le matériau et la technique de gravure utilisés. Par ailleurs, la distance moyenne entre deux puits est typiquement d'environ 550 μm .

Sur la figure 3, la vue en perspective d'une tête de distribution 1 comporte huit puits 10 reliés individuellement à huit réservoirs 4 par huit micro-canaux 20. Les dimensions typiques d'une telle tête sont :

- longueur : 3mm
- largeur : 5mm
- épaisseur : 1mm selon épaisseur des réservoirs

La vue en coupe représentée en figure 4, selon le plan IV-IV de la figure précédente, montre bien l'indépendance des réservoirs 4 permettant la distribution ou l'aspiration de réactifs différents 5a et 5b.

En variante, les figures 5 et 6 montrent, respectivement en vue cavalière et en coupe selon le plan V-V, une tête de distribution comportant seize puits 10 reliés individuellement à seize réservoirs 4 par seize micro-canaux 20. Une telle configuration est avantageusement utilisée pour distribuer seize réactifs différents.

La face inférieure 2i sensiblement plane du substrat 2 de la tête de distribution des figures 5 et 6, est représentée en vue cavalière sur la figure 7 et en variante sur la figure 8. En figure 7, les parois des puits 10 apparaissent en saillie sous forme de pyramides. Cette forme inclinée des parois est avantageuse car le réactif ne risque pas de s'accumuler et donc de stagner. Par ailleurs du point de vue hydrodynamique, elle permet un meilleur écoulement avec une répartition des pressions et des vitesses de manière continue. En figure 8, ces mêmes parois 11 apparaissent en transparence sous une forme cylindrique, de diamètre égal à 100 microns, prolongée par un embout centré 6, également cylindrique et de diamètre de 20 microns.

Lorsqu'un seul réactif est distribué ou aspiré simultanément à travers les puits, la configuration de membrane illustrée en figure 9 est avantageusement mise en œuvre. Dans cette configuration, la membrane 3 possède une ouverture unique 30 qui permet d'alimenter ou d'aspirer un

même réactif sur tous les puits 4 sans l'utilisation de micro-canaux. Ce réactif est transporté depuis ou aspiré vers un réservoir distant (non représenté) à travers un tuyau souple 7 couplé à un micro-capillaire unique 40 traversant la membrane 3.

5 Lorsque plusieurs réactifs sont distribués, par exemple quatre mononucléides A, C, T, G, dans le cas illustré par la vue en perspective de la figure 10, la membrane précédente est cloisonnée par trois traversées 31 de manière à former quatre conduits indépendants : 32 d'alimentation ou d'aspiration des réactifs. Ces conduits sont reliés à quatre micro-capillaires 41
10 couplées, à travers la membrane 3 et quatre tuyaux souples 7, à quatre réservoirs distants (non représentés). Une telle configuration est particulièrement adaptée à la distribution des quatre nucléotides de base pour former des sondes 9 pour la préparation de micro-puces sur une lame 82 recouverte d'une couche de silane 83 pour permettre le greffage des premiers nucléides. La lame 82 est supportée par un dispositif de positionnement 86,
15 selon les axes XYZ.

Dans le but de distribuer le ou les réactifs par micro-gouttellettes 50 de manière sélective, c'est-à-dire en sollicitant chaque puits indépendamment les uns des autres, la membrane 3 est sollicitée localement,
20 comme illustré sur la vue en coupe de la figure 11. L'actionnement sélectif des puits 10 de distribution est provoqué par des moyens déformant localement la membrane 3 par application d'une force F .

Sur les vues en coupe des figures 12a et 12b, les deux phases d'actionnement d'un puits 10 par déformation locale de la membrane actionnées par des moyens électromagnétiques de déclenchement sont
25 illustrés. Ces moyens sont formés d'un électroaimant élémentaire 60 composé d'un circuit d'excitation 61 générateur de courant, comprenant notamment une bobine 63 couplée à un noyau d'entrefer 64. Les moyens électromagnétiques comprennent également une pastille aimantée 65 fixée sur la membrane 3 au droit du puits et susceptible d'être polarisée par l'électroaimant. La pastille
30 peut alternativement être un aimant permanent, ou en matériau dia ou paramagnétique.

Lorsque le courant 62 circule, le noyau 63 exerce une force d'attraction F sur la pastille 65. La membrane 3 est alors déformée vers
35 l'électroaimant et le liquide 51 est stoppé à l'écoulement à travers l'orifice 13 (figure 12a). Lorsque le courant 62 circule dans l'autre sens par inversion des

pôles, le noyau 63 exerce une force de répulsion F_r sur la pastille aimantée 65. La membrane est déformée en creux et le liquide 51 est expulsé sous forme de micro-gouttelettes 50 à travers l'orifice 13 de la buse d'éjection (figure 12b), avec un volume calibré et contrôlé par les dimensions de la buse ainsi que par l'amplitude et la durée du signal électrique appliqué.

Alternativement, l'éjection de gouttelettes peut se faire par application d'impulsions de courant électrique ou par application d'un courant alternatif à la fréquence de résonance propre de la membrane.

Afin de réaliser une distribution sélective de micro-gouttelettes, c'est-à-dire dont la commande est individualisée au niveau de chaque puits, la déformation locale est réalisée par un ensemble de moyens de déclenchement. Les figures 13a et 13b illustrent en coupe un tel ensemble formé respectivement par des moyens électromagnétiques et des moyens piézoélectriques.

Les moyens électromagnétiques comprennent des électroaimants 60 et des aimants 65, disposés sous forme matricielle au droit de chaque puits 4, et les moyens piézoélectriques comprennent des pastilles piézoélectriques 70, couplées à des circuits d'excitation 61 du même type que ceux utilisés pour les moyens électromagnétiques. Le déclenchement piézoélectrique de micro-gouttelettes 50 (figure 13b) est activé de la même façon que dans le cas de déclenchement électromagnétique (figures 12 et 13a) par fermeture des circuits 61, l'ouverture des interrupteurs 66 arrêtant l'écoulement des gouttelettes 50. Dans le cas de l'utilisation d'actionneurs piézoélectriques, les signaux électriques sont cette fois-ci des différences de potentielles appliquées aux bornes des éléments piézoélectriques.

L'ensemble des moyens de déclenchement est géré par une unité de commande (non représentée) programmable à travers un réseau de couplage ou de multiplexage, dont la mise en œuvre relève du domaine de compétence de l'homme de l'art. Une telle unité permet de déclencher simultanément ou successivement l'aspiration ou la distribution d'un même réactif ou de réactifs différents à travers les puits.

Il est ainsi possible d'obtenir un débit d'éjection de gouttelettes élevé, par exemple 100 gouttelettes par seconde pour un même puits. Il est ainsi possible d'atteindre le débit de 100 000 pour une tête d'impression de 1000 puits, avec une déformation de la membrane contrôlée par le signal extérieure. En effet le liquide étant quasiment incompressible, le rapport entre

les vitesses de déplacement du liquide entre l'ouverture supérieure et l'orifice d'éjection du puits est inversement proportionnel au rapport des surfaces respectives. Dans l'exemple illustré, le rapport des côtés des orifices étant d'environ 15, la vitesse d'éjection des gouttelettes est donc environ 15 fois supérieure à celle de déformation des membranes.

Pour la préparation d'une cartouche de distribution selon l'invention, des réactifs sont aspirés dans une tête de distribution comme illustré sur la vue en coupe de la figure 14. Pour effectuer une telle aspiration, les réactifs sont contenus dans des micro-cuvettes 80 gravées sur une plaque 81 selon des dimensions correspondantes à celle des puits 4. Cette plaque comporte dans l'exemple 9 600 micro-cuvettes espacées de 0,6 mm. Quelques milliers de cuvettes par cm^2 peuvent également être réalisées, alors que les plaques de titration couramment utilisées ne comportent actuellement que 1 à 4 cuvettes par cm^2 .

La plaque est déplacée par réglage micrométrique (direction Z) vers le substrat 2 jusqu'à écraser des joints d'étanchéité en téflon® 82 fixés en bordure des micro-cuvettes 80. D'autres matériaux peuvent être alternativement utilisés pour former les joints : en silicone, vuiton®, en polymère, élastomère ou matériau thermoplastique adapté.

Les réactifs sont alors aspirés dans les puits par le déclenchement d'une pompe 8 montée sur un tuyau d'évacuation 7 couplé aux conduits d'évacuation des puits 4, comme détaillé ci-dessus. La plaquette 81 est également mobile selon les directions XY afin de prévoir d'autres aspirations à partir d'autres micro-cuvettes permettant d'effectuer des mélanges de réactifs dans un même puits. La plaque est placée sur une table de positionnement XYZ (représentée en figure 10).

Suivant les applications, les réactifs peuvent être de type varié : ADNc, oligonucléotides, gènes, cellules, ARNm, protéines, séquences d'ADN ou d'ARN amplifiées par PCR (initiales en terminologie anglaise de « Polymerization Chain Reaction »), antigènes et anticorps, molécules thérapeutiques, sérums, etc.

En vue de la préparation de sondes pour réaliser une bio-puce, le dépôt d'oligonucléotides ou de protéines sur une plaquette de Titration ou sur une lame mobile est illustré sur la vue en coupe de la figure 15. Une tête de distribution est alimentée par des réservoirs et l'action de pompes conformément à la figure 10. Des réactifs thérapeutiques différents

à 56 sont distribués dans les puits. Des cellules à traiter 15 sont déposées dans les micro-cuvettes d'une plaque de Titration 81. La tête et la plaque sont alignées avec précision à l'aide de repères (non représentés). La plaque de Titration est réalisée par injection d'un matériau thermoplastique, tel que du polyméthacrylate de méthyle ou un polycarbonate.

Les sondes sont formées à la demande par programmation de l'unité de gestion des actionneurs conjointement avec le déplacement de la lame, ce qui permet de former immédiatement les sondes lors de ce déplacement : la durée de formation des sondes 9 est optimisée, permettant de gagner un temps considérable par rapport à la formation par couches successives de l'état de la technique. Le haut débit obtenu avec le système de distribution selon l'invention permet de réaliser des sondes pouvant atteindre par exemple 60 à 70 nucléotides nécessaires pour les applications en génomique fonctionnelle et expressions de gènes. La plaquette ou la lame est déplacé par réglage micrométrique selon des directions XY pour positionner les orifices des éjecteurs en regard avec les zones à imprimer.

Dans un autre exemple d'application à la détection d'hybridation dans le cadre d'un test génétique, tel qu'illustré en coupe sur la figure 16, la lame 82, préparée selon la figure précédente, est balayée par un flux d'ADN de patient 90. L'ADN du patient est au préalable marqué magnétiquement par greffage de billes 91, utilisé dans l'état de la technique pour immobiliser des molécules dans un champ magnétique ou, alternativement, par fluorescence.

L'avantage supplémentaire de la présente solution est de réutiliser les moyens de déclenchement de distribution pour réaliser la lecture du test par détection, ce qui permet de réduire la quantité de matériel électronique utilisé, alors que, dans l'art antérieur, il est nécessaire de disposer de bobines de lecture dans les cuvettes de titrage.

L'hybridation ou l'interaction immunologique permet de fixer les ADN du patient sur certaines des sondes 9. La détection de ces hybridations est réalisée par formation d'un courant induit dans les circuits 61 au droit des sondes hybridées ou par détection optique. Cette détection est rendue possible du fait de la précision de positionnement des sondes et du fait, dans le cas d'un marquage magnétique, que ce sont les mêmes circuits 61 qui assurent la distribution des sondes et la détection des hybridations.

Dans l'application iono-phorétique, l'administration percutanée de médicaments est réalisée, en référence à la vue en coupe de la figure 17, à partir d'une tête d'impression à un puits 4 de distribution. Dans ce puits, un médicament est distribué conformément à la méthode exposée ci-dessus. Une
 5 tension de quelques millivolts est appliquée par un circuit générateur de tension 61 sur une cellule piézoélectrique 70 afin de déformer la membrane 3. Une quantité précalibrée de médicament 50 pendant une durée donnée peut ainsi être administrée. Deux des parois opposées 11 du puits peuvent également être polarisées afin de faciliter l'absorption du médicament en
 10 provoquant la dilatation des pores de la peau.

L'invention n'est pas limitée aux exemples de réalisation décrits et représentés.

Il est par exemple possible de réaliser des configurations de puits, de moyens déclencheurs et cuvettes de Titration autres que matriciels :
 15 des configurations de forme circulaire concentrique ou en spirale conviennent également.

Les micro-canaux peuvent également être gravés sur le substrat ou sur la membrane. Il est possible de réaliser la membrane ou le substrat avec une structure multicouche permettant d'intégrer les micro-
 20 canaux de manière tri-dimensionnelle dans des couches différentes. Les micro-canaux peuvent alors être couplés aux puits par des connexions perpendiculaires aux ouvertures supérieures des puits.

Par ailleurs, il est possible d'utiliser d'autres techniques pour déclencher la déformation locale de la membrane, par effet bilame utilisant les
 25 effets thermoélastiques ou la magnétostriction : la déformation thermoélastique d'un matériau de type bilame disposé sous forme de barrettes élémentaires au droit des puits sur la membrane. Chaque barrette peut être formée d'une couche de matériau ferromagnétique et d'une couche de matériau conducteur (en Cu, Al, Au, etc.), le matériau ferromagnétique se
 30 déformant sous l'effet d'un champ magnétique produit par l'électroaimant. Il est également possible d'agir par des moyens pneumatiques, par électro-vaporisation, ou par l'application de champs électrostatiques.

En outre, les forces de déformation de la membrane ou son échauffement peuvent être créés, par exemple à l'aide de courants de
 35 Foucault. La mise en résonance propre peut être effectuée par déformation de la membrane ou par vibration de l'extrémité de la bus .

Par ailleurs, d'autres adaptations sont possibles afin de satisfaire à des applications spécifiques. Par exemple, pour le criblage de cellules tests dans le domaine pharmacologique, en référence à la figure 15, les micro-cuvettes 80 d'une lame de Titration 81 sont équipées d'électrodes polarisées 87. Le test de réactivité des cellules peut être optique, c'est-à-dire par fluorescence et/ou spectroscopie, ou électrique par mesure d'impédance électrique ou électrochimique. Il est également possible d'appliquer, inversement, une différence de potentiel de valeur adaptée entre ces électrodes afin de créer une polarisation dans les cellules et favoriser ainsi l'effet thérapeutique sur des cellules.

Une autre application du système de distribution selon l'invention concerne la distribution de réactifs dans les colonnes de spectrométrie de masse pour la caractérisation de composés, par alimentation parallèle ou séquentielle comme décrit plus haut. Cette application peut également convenir aux chromatographes.

REVENDECATIONS

1. Système de distribution de micro-gouttelettes à haut rendement, comportant un substrat (2) recouvert d'une membrane (3) et des moyens (65, 70) de déformation de la membrane au droit de chaque cavité (10) formée dans le substrat (2), caractérisé en ce que les cavités, gravées dans un matériau constituant le substrat, se présentent sous forme de puits traversant le substrat avec une paroi latérale continue (11) de symétrie axiale, et en ce que chaque puits débouche sur la face supérieure et la face inférieure du substrat selon respectivement un orifice d'alimentation (12) et une buse (14) ouverte selon un orifice d'éjection (13), l'orifice d'alimentation présentant une ouverture supérieure à l'orifice (13) de la buse, et la buse présentant un rapport de forme pouvant aller de 1 à 20.

2. Système de distribution de micro-gouttelettes selon la revendication 1, dans lequel la densité de puits atteint $10\,000/\text{cm}^2$, avec un débit d'au moins un million de gouttelettes à la seconde.

3. Système de distribution de micro-gouttelettes selon la revendication 1, dans lequel les puits sont configurés sous forme matriciel, circulaire concentrique, en spirale, ou selon une combinaison de ces configurations.

20 4. Système de distribution de micro-gouttelettes selon l'une
quelconque des revendications précédentes, dans lequel la membrane ou le
substrat présentent une structure multicouche intégrant les micro-canaux de
manière tri-dimensionnelle dans des couches différentes, les micro-canaux
étant alors couplés aux puits par des connexions perpendiculaires aux
25 ouvertures supérieures des puits.

5. Système de distribution de micro-gouttelettes selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'ensemble des moyens de déformation est géré par une unité de commande programmable à travers un réseau de multiplexage pour déclencher simultanément ou successivement l'aspiration ou l'éjection de réactifs identiques ou différents à travers tous les puits, à travers des blocs de puits présélectionnés ou certains puits présélectionnés.

6. Système de distribution de micro-gouttelettes selon l'une
quelconque des revendications précédentes, dans lequel le matériau du
35 substrat ou de la membrane est choisi parmi les matériaux semi-conducteurs,
le polysilicium, les verres, les nitrures de silicium, les céramiques, les

7. Système de distribution de micro-gouttelettes selon la revendication 5 ou 6, dans lequel la gravure du substrat ou de la membrane est choisie parmi la gravure chimique, la RIE, D-RIE, la photolithographie, la gravure par électroérosion ou électroformage, le moulage et la polymérisation, le découpage au laser, les ultrasons, ou la projection d'abrasifs.

9. Système de distribution de micro-gouttelettes selon la revendication 1, dans lequel les moyens de déformation locale (65, 70) de la membrane (3) sont constitués par des actionneurs électromagnétiques et piézoélectriques, magnétostrictifs, électrostatiques ou par électro-évaporation.

20 11. Système de distribution de micro-gouttelettes selon la revendication 1, dans lequel les puits de chaque ligne d'une configuration matricielle sont alimentés par un même réservoir (4) à travers un micro-canal (20) formé dans la membrane parallèlement à la ligne de puits (10) et couplé latéralement à la ligne ou orthogonalement au plan du substrat (2), les
25 réservoirs étant gravés dans la membrane ou disposés à distance et reliés aux micro-canaux par des connexions souples.

12. Système de distribution de micro-gouttelettes selon la revendication 1, dans lequel la tête d'impression (1) possède un nombre de lignes égal à un multiple de quatre, afin de procéder à la synthèse de sondes d'ADN à partir des quatre mononucléotides (A, C, T, G) pour la préparation de bio-puces, et dans lequel les puits de chaque ligne sont alimentés par un même réservoir à travers un micro-canal (32) formé dans la membrane (3) parallèlement aux lignes, les réservoirs étant gravés dans la membrane ou disposés à distance et reliés aux micro-canaux par des connexions souples (7).

13. Cartouche de distribution comprenant au moins un système de distribution selon l'une quelconque des revendications précédentes, prérempli de réactifs (51), et des plaquettes de Titration (81) pouvant présenter des micro-cuvettes (80) formées par gravure de type micro-électronique, par usinage, par moulage, et par thermoformage.

14. Kit de distribution comprenant au moins un système de distribution selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, équipée d'au moins une pompe d'aspiration (8), et au moins une plaquette de Titration (81), pouvant être préremplies de réactif.

15. Cartouche selon la revendication 13 ou kit selon la revendication 14, dans lequel la plaquette de Titration présentent des micro-cuvettes équipées d'électrodes polarisées, le test de réactivité des cellules étant optique ou électrique.

16. Plaquette de Titration selon la revendication 15, dans laquelle une différence de potentiel est appliquée entre ces électrodes afin de créer une polarisation dans les cellules et favoriser l'effet thérapeutique sur des cellules.

17. Application de la cartouche selon la revendication 13 ou du kit selon la revendication 14 à la préparation de bio-puces, par synthèse in situ ou dépôt d'oligonucléotides pré-synthétisés, au criblage sur molécules biologiques, chimiques ou sur cellules, à la préparation de médicaments ou aux tests pharmaceutiques ou de dépistages immunologiques, biochimiques ou génétiques.

18. Application du système de distribution selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, à l'administration percutanée de médicaments par iono-phorèse comportant un système d'application d'une différence de potentiel adéquate sur une cellule piézoélectrique (70) pour l'administration d'une quantité calibrée d'au moins un médicament contenu ou formé dans au moins un puits.

19. Application au criblage de cellules tests dans le domaine pharmacologique d'un système de distribution selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans lequel des médicaments sont déposés sur des cellules contenues dans les micro-cuvettes (80) d'une lame de Titration (81), équipées d'électrodes polarisées, le test de réactivité des cellules étant optique ou électrique.

20. Application selon la revendication précédente, dans laquelle une différence de potentiel de valeur adaptée est appliquée entre ces électrodes afin de créer une polarisation dans les cellules et favoriser ainsi l'effet thérapeutique sur les cellules.

5 21 Application du système de distribution selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, à la filtration sélective par fixation sur les parois des puits d'une tête d'impression de bio-cellules identiques ou différentes ou de composés biochimiques par puits ou par blocs de puits.

10 22. Application du système de distribution selon la revendication précédente, dans laquelle la tête d'impression est intégrée à l'embout d'une seringue.

23. Application du système de distribution selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, à l'alimentation parallèle ou séquentielle de colonnes de spectromètre de masse ou de chromatographes.

TE05F90" 00528860

ABREGE DESCRIPTIF

SYSTEME DE DISTRIBUTION PARALLELE ET SELECTIVE DE MICRO-GOUTTELETTES A HAUT RENDEMENT, CARTOUCHE TRANSPORTABLE AINSI QUE KIT DE DISTRIBUTION DE MISE EN ŒUVRE, ET APPLICATIONS D'UN TEL SYSTEME

L'invention vise à permettre une augmentation considérable du rendement de distribution sélective de micro-gouttelettes, à réaliser une sélectivité spatiale et ciblée en distribuant un réactif prédéterminé sur le site prédéterminé, et à réaliser un système multifonctionnel et facile à adapter.

Un exemple de système de distribution selon l'invention comporte un substrat (2) recouvert d'une membrane (3) et des moyens de déformation (65) de la membrane au droit de chaque cavité formée dans le substrat, et dans lequel les cavités, gravées dans un matériau constituant le substrat (2) selon un arrangement matriciel, se présentent sous forme de puits (10) traversant le substrat avec des parois latérales continues (11) de symétrie axiale; chaque puits débouche sur la face supérieure et la face inférieure du substrat selon respectivement un orifice d'alimentation (12) et une buse d'éjection (14), l'orifice d'alimentation présentant une ouverture sensiblement supérieure à l'orifice (13) de la buse.

Application à la réalisation de cartouches et de kits miniaturisés dans le domaine biochimique et pharmaceutique, ou encore dans les domaines de la cosmétique, de l'instrumentation analytique, de l'impression par jet d'encre ou de l'électronique automobile.

FIGURE 13a

FOOTNOTES: 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840. 841. 842. 843. 844. 845. 846. 847. 848. 849. 850. 851. 852. 853. 854. 855. 856. 857. 858. 859. 860. 861. 862. 863. 864. 865. 866. 867. 868. 869. 870. 871. 872. 873. 874. 875. 876. 877. 878. 879. 880. 881. 882. 883. 884. 885. 886. 887. 888. 889. 890. 891. 892. 893. 894. 895. 896. 897. 898. 899. 900. 901. 902. 903. 904. 905. 906. 907. 908. 909. 910. 911. 912. 913. 914. 915. 916. 917. 918. 919. 920. 921. 922. 923. 924. 925. 926. 927. 928. 929. 930. 931. 932. 933. 934. 935. 936. 937. 938. 939. 940. 941. 942. 943. 944. 945. 946. 947. 948. 949. 950. 951. 952. 953. 954. 955. 956. 957. 958. 959. 960. 961. 962. 963. 964. 965. 966. 967. 968. 969. 970. 971. 972. 973. 974. 975. 976. 977. 978. 979. 980. 981. 982. 983. 984. 985. 986. 987. 988. 989. 990. 991. 992. 993. 994. 995. 996. 997. 998. 999. 1000. 1001. 1002. 1003. 1004. 1005. 1006. 1007. 1008. 1009. 1010. 1011. 1012. 1013. 1014. 1015. 1016. 1017. 1018. 1019. 1020. 1021. 1022. 1023. 1024. 1025. 1026. 1027. 1028. 1029. 1030. 1031. 1032. 1033. 1034. 1035. 1036. 1037. 1038. 1039. 1040. 1041. 1042. 1043. 1044. 1045. 1046. 1047. 1048. 1049. 1050. 1051. 1052. 1053. 1054. 1055. 1056. 1057. 1058. 1059. 1060. 1061. 1062. 1063. 1064. 1065. 1066. 1067. 1068. 1069. 1070. 1071. 1072. 1073. 1074. 1075. 1076. 1077. 1078. 1079. 1080. 1081. 1082. 1083. 1084. 1085. 1086. 1087. 1088. 1089. 1090. 1091. 1092. 1093. 1094. 1095. 1096. 1097. 1098. 1099. 1100. 1101. 1102. 1103. 1104. 1105. 1106. 1107. 1108. 1109. 1110. 1111. 1112. 1113. 1114. 1115. 1116. 1117. 1118. 1119. 1120. 1121. 1122. 1123. 1124. 1125. 1126. 1127. 1128. 1129. 1130. 1131. 1132. 1133. 1134. 1135. 1136. 1137. 1138. 1139. 1140. 1141. 1142. 1143. 1144. 1145. 1146. 1147. 1148. 1149. 1150. 1151. 1152. 1153. 1154. 1155. 1156. 1157. 1158. 1159. 1160. 1161. 1162. 1163. 1164. 1165. 1166. 1167. 1168. 1169. 1170. 1171. 1172. 1173. 1174. 1175. 1176. 1177. 1178. 1179. 1180. 1181. 1182. 1183. 1184. 1185. 1186. 1187. 1188. 1189. 1190. 1191. 1192. 1193. 1194. 1195. 1196. 1197. 1198. 1199. 1200. 1201. 1202. 1203. 1204. 1205. 1206. 1207. 1208. 1209. 1210. 1211. 1212. 1213. 1214. 1215. 1216. 1217. 1218. 1219. 1220. 1221. 1222. 1223. 1224. 1225. 1226. 1227. 1228. 1229. 1230. 1231. 1232. 1233. 1234. 1235. 1236. 1237. 1238. 1239. 1240. 1241. 1242. 1243. 1244. 1245. 1246. 1247. 1248. 1249. 1250. 1251. 1252. 1253. 1254. 1255. 1256. 1257. 1258. 1259. 1260. 1261. 1262. 1263. 1264. 1265. 1266. 1267. 1268. 1269. 1270. 1271. 1272. 1273. 1274. 1275. 1276. 1277. 1278. 1279. 1280. 1281. 1282. 1283. 1284. 1285. 1286. 1287. 1288. 1289. 1290. 1291. 1292. 1293. 1294. 1295. 1296. 1297. 1298. 1299. 1300. 1301. 1302. 1303. 1304. 1305. 1306. 1307. 1308. 1309. 1310. 1311. 1312. 1313. 1314. 1315. 1316. 1317. 1318. 1319. 1320. 1321. 1322. 1323. 1324. 1325. 1326. 1327. 1328. 1329. 1330. 1331. 1332. 1333. 1334. 1335. 1336. 1337. 1338. 1339. 1340. 1341. 1342. 1343. 1344. 1345. 1346. 1347. 1348. 1349. 1350. 1351. 1352. 1353. 1354. 1355. 1356. 1357. 1358. 1359. 1360. 1361. 1362. 1363. 1364. 1365. 1366. 1367. 1368. 1369. 1370. 1371. 1372. 1373. 1374. 1375. 1376. 1377. 1378. 1379. 1380. 1381. 1382. 1383. 1384. 1385. 1386. 1387. 1388. 1389. 1390. 1391. 1392. 1393. 1394. 1395. 1396. 1397. 1398. 1399. 1400. 1401. 1402. 1403. 1404. 1405. 1406. 1407. 1408. 1409. 1410. 1411. 1412. 1413. 1414. 1415. 1416. 1417. 1418. 1419. 1420. 1421. 1422. 1423. 1424. 1425. 1426. 1427. 1428. 1429. 1430. 1431. 1432. 1433. 1434. 1435. 1436. 1437. 1438. 1439. 1440. 1441. 1442. 1443. 1444. 1445. 1446. 1447. 1448. 1449. 1450. 1451. 1452. 1453. 1454. 1455. 1456. 1457. 1458. 1459. 1460. 1461. 1462. 1463. 1464. 1465. 1466. 1467. 1468. 1469. 1470. 1471. 1472. 1473. 1474. 1475. 1476. 1477. 1478. 1479. 1480. 1481. 1482. 1483. 1484. 1485. 1486. 1487. 1488. 1489. 1490. 1491. 1492. 1493. 1494. 1495. 1496. 1497. 1498. 1499. 1500. 1501. 1502. 1503. 1504. 1505. 1506. 1507. 1508. 1509. 1510. 1511. 1512. 1513. 1514. 1515. 1516. 1517. 1518. 1519. 1520. 1521. 1522. 1523. 1524. 1525. 1526. 1527. 1528. 1529. 1530. 1531. 1532. 1533. 1534. 1535. 1536. 1537. 1538. 1539. 1540. 1541. 1542. 1543. 1544. 1545. 1546. 1547. 1548. 1549. 1550. 1551. 1552. 1553. 1554. 1555. 1556. 1557. 1558. 1559. 1560. 1561. 1562. 1563. 1564. 1565. 1566. 1567. 1568. 1569. 1570. 1571. 1572. 1573. 1574. 1575. 1576. 1577. 1578. 1579. 1580. 1581. 1582. 1583. 1584. 1585. 1586. 1587. 1588. 1589. 1590. 1591. 1592. 1593. 1594. 1595. 1596. 1597. 1598. 1599. 1600. 1601. 1602. 1603. 1604. 1605. 1606. 1607. 1608. 1609. 1610. 1611. 1612. 1613. 1614. 1615. 1616. 1617. 1618. 1619. 1620. 1621. 1622. 1623. 1624. 1625. 1626. 1627. 1628. 1629. 1630. 1631. 1632. 1633. 1634. 1635. 1636. 1637. 1638. 1639. 1640. 1641. 1642. 1643. 1644. 1645. 1646. 1647. 1648. 1649. 1650. 1651. 1652. 1653. 1654. 1655. 1656. 1657. 1658. 1659. 1660. 1661. 1662. 1663. 1664. 1665. 1666. 1667. 1668. 1669. 1670. 1671. 1672. 1673. 1674. 1675. 1676. 1677. 1678. 1679. 1680. 1681. 1682. 1683. 1684. 1685. 1686. 1687. 1688. 1689. 1690. 1691. 1692. 1693. 1694. 1695. 1696. 1697. 1698. 1699. 1700. 1701. 1702. 1703. 1704. 1705. 1706. 1707. 1708. 1709. 1710. 1711. 1712. 1713. 1714. 1715. 1716. 1717. 1718. 1719. 1720. 1721. 1722. 1723. 1724. 1725. 1726. 1727. 1728. 1729. 1730. 1731. 1732. 1733. 1734. 1735. 1736. 1737. 1738. 1739. 1740. 1741. 1742. 1743. 1744. 1745. 1746. 1747. 1748. 1749. 1750. 1751. 1752. 1753. 1754. 1755. 1756. 1757. 1758. 1759. 1760. 1761. 1762. 1763. 1764. 1765. 1766. 1767. 1768. 1769. 1770. 1771. 1772. 1773. 1774. 1775. 1776. 1777. 1778. 1779. 1780. 1781. 1782. 1783. 1784. 1785. 1786. 1787. 1788. 1789. 1790. 1791. 1792. 1793. 1794. 1795. 1796. 1797. 1798. 1799. 1800. 1801. 1802. 1803. 1804. 1805. 1806. 1807. 1808. 1809. 1810. 1811. 1812. 1813. 1814. 1815. 1816. 1817. 1818. 1819. 1820. 1821. 1822. 1823. 1824. 1825. 1826. 1827. 1828. 1829. 1830. 1831. 1832. 1833. 1834. 1835. 1836. 1837. 1838. 1839. 1840. 1841. 1842. 1843. 1844. 1845. 1846. 1847. 1848. 1849. 1850. 1851. 1852. 1853. 1854. 1855. 1856. 1857. 1858. 1859. 1860. 1861. 1862. 1863. 1864. 1865. 1866. 1867. 1868. 1869. 1870. 1871. 1872. 1873. 1874. 1875. 1876. 1877. 1878. 1879. 1880. 1881. 1882. 1883. 1884. 1885. 1886. 1887. 1888. 1889. 1890. 1891. 1892. 1893. 1894. 1895. 1896. 1897. 1898. 1899. 1900. 1901. 1902. 1903. 1904. 1905. 1906. 1907. 1908. 1909. 1910. 1911. 1912. 1913. 1914. 1915. 1916. 1917. 1918. 1919. 1920. 1921. 1922. 1923. 1924. 1925. 1926. 1927. 1928. 1929. 1930. 1931. 1932. 1933. 1934. 1935. 1936. 1937. 1938. 1939. 1940. 1941. 1942. 1943. 1944. 1945. 1946. 1947. 1948. 1949. 1950. 1951. 1952. 1953. 1954. 1955. 1956. 1957. 1958. 1959. 1960. 1961. 1962. 1963. 1964. 1965. 1966. 1967. 1968. 1969. 1970. 1971. 1972. 1973. 1974. 1975. 1976. 1977. 1978. 1979. 1980. 1981. 1982. 1983. 1984. 1985. 1986. 1987. 1988. 1989. 1990. 1991. 1992. 1993. 1994. 1995. 1996. 1997. 1998. 1999. 2000. 2001. 2002. 2003. 2004. 2005. 2006. 2007. 2008. 2009. 2010. 2011. 2012. 2013. 2014. 2015. 2016. 2017. 2018. 2019. 2020. 2021. 2022. 2023. 2024. 2025. 2026. 2027. 2028. 2029. 2030. 2031. 2032. 2033. 2034. 2035. 2036. 2037. 2038. 2039. 2040. 2041. 2042. 2043. 2044. 2045. 2046. 2047. 2048. 2049. 2050. 2051. 2052. 2053. 2054. 2055. 2056. 2057. 2058. 2059. 2060. 2061. 2062. 2063. 2064. 2065. 2066. 2067. 2068. 2069. 2070. 2071. 2072. 2073. 2074. 2075. 2076. 2077. 2078. 2079. 2080. 2081. 2082. 2083. 2084. 2085. 2086. 2087. 2088. 2089. 2090. 2091. 2092. 2093. 2094. 2095. 2096. 2097. 2098. 2099. 2100. 2101. 2102. 2103. 2104. 2105. 2106. 2107. 2108. 2109. 2110. 2111. 2112. 2113. 2114. 2115. 2116. 2117. 2118. 2119. 2120. 2121. 2122. 2123. 2124. 2125. 2126. 2127. 2128. 2129. 2130. 2131. 2132. 2133. 2134. 2135. 2136. 2137. 2138. 2139. 2140. 2141. 2142. 2143. 2144. 2145. 214